胁迫意大利蜜蜂幼虫肠道的球囊菌的转录组分析

陈大福[1,#]，郭　睿[1,#,*]，熊翠玲[1,#]，梁　勤[1]，郑燕珍[1]，徐细建[1]，
黄枳腱[1]，张曌楠[1]，张　璐[1]，李汶东[1]，童新宇[1]，席伟军[2]

(1. 福建农林大学蜂学学院，福州 350002；2. 金华农业科学研究院，浙江金华 321000)

摘要：【目的】本研究旨在通过趋势分析对胁迫意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*(简称意蜂)幼虫肠道的球囊菌 *Ascosphaera apis* 的差异表达基因(DEGs)进行转录组分析。【方法】将纯化的球囊菌孢子配制为 1×10^7 孢子/mL 的饲料饲喂意蜂 3 日龄幼虫，利用 Illumina HiSeq 2500 平台对球囊菌胁迫的意蜂幼虫肠道 cDNA 进行测序，将过滤得到的有效读段(clean reads)映射(mapping)到核糖体数据库及意蜂参考基因组，最后将未映射上的 reads 映射到本课题组组装并注释的球囊菌参考转录组。利用 STEM 软件对 DEGs 进行趋势分析。利用 WEGO 软件对显著表达模式中的 DEGs 进行 GO 富集分析。利用 Blastall 对显著表达模式中的 DEGs 进行 KEGG 代谢通路富集分析。最后，通过对随机选取的 6 个 DEGs 进行 RT-qPCR 分析，对 RNA-seq 数据进行验证。【结果】球囊菌胁迫意蜂幼虫肠道样品的 Illumina 测序共得到球囊菌的 25 454 076 条原始读段(raw reads)，经过滤得到 24 909 820 条 clean reads，Q30 均在 93.46% 以上。趋势分析结果显示，19 893 个 DEGs 聚类为 8 个表达模式，其中有 12 151 个 DEGs 聚类为 3 个表现为显著上调趋势的表达模式。GO 富集分析结果显示，表现上调趋势的 DEGs 富集在 40 个 GO term，富集基因数最多的为细胞进程(cellular process)(2 601 unigenes)，其次为代谢进程(metabolic process)(2 553 unigenes)和细胞(cell)(2 522 unigenes)。KEGG 代谢通路富集分析结果显示，上调趋势中的 DEGs 富集在 119 个代谢通路上，其中富集基因数最多的是核糖体(ribosome)(213 unigenes)，其次为氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids)(154 unigenes)和内质网蛋白加工(protein processing in endoplasmic reticulum)(130 unigenes)。共有 48 个 DEGs 富集在 MAPK 信号通路上，聚类分析结果显示，这些 DEGs 随着胁迫时间的延长表达水平逐渐增强。RT-qPCR 结果显示，6 个 DEGs 的表达水平变化趋势与 RNA-seq 数据一致，证明了本研究中的转录组数据真实可靠。【结论】本研究为在分子水平揭示球囊菌的致病机理提供了重要信息，也为阐释球囊菌胁迫意蜂幼虫过程中的病原-宿主互作机制奠定了基础。

关键词：意大利蜜蜂；球囊菌；幼虫肠道；RNA-seq；转录组；差异表达基因

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2017)04-0401-11

Transcriptomic analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut of *Apis mellifera ligustica* (Hyemenoptera: Apidae)

CHEN Da-Fu[1,#], GUO Rui[1,#,*], XIONG Cui-Ling[1,#], LIANG Qin[1], ZHENG Yan-Zhen[1], XU Xi-Jian[1], HUANG Zhi-Jian[1], ZHANG Zhao-Nan[1], ZHANG Lu[1], LI Wen-Dong[1], TONG Xin-Yu[1], XI Wei-Jun[2]

(1. College of Bee Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Jinhua Academy of Agricultural Sciences, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

基金项目：国家自然科学基金项目(30800806)；现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-45-KXJ7)；福建农林大学科技发展资金(KF2015123)

作者简介：陈大福，男，1973 年 3 月生，河南信阳人，副教授，研究方向为蜜蜂保护学，E-mail：dfchen826@163.com；郭睿，男，1987 年 5 月生，安徽六安人，讲师，研究方向为蜜蜂保护学，E-mail：fafu_ruiguo@126.com；熊翠玲，女，1977 年 1 月生，福建龙岩人，实验师，研究方向为蜜蜂保护学，E-mail：992355037@qq.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author，E-mail：fafu_ruiguo@126.com

收稿日期 Received：2016-12-26；接受日期 Accepted：2017-02-23

Abstract:【Aim】This research is designed to conduct transcriptomic analysis of the differentially expressed genes (DEGs) of *Ascosphaera apis* stressing larval guts of *Apis mellifera ligustica* via trend analysis.【Methods】The purified *A. apis* spores at a concentration of 1×10^7 spores/mL was used to feed 3-day-old larvae of *A. m. ligustica*, and then the cDNA of stressed larval guts was sequenced at Illumina HiSeq 2500 platform. After filtration, the clean reads were used to mapping the ribosome database and the reference genome of *A. m. ligustica*, and the unmapped reads were used to mapping the reference transcriptome of *A. apis* assembled previously. The STEM software was used to analyze the gene expression patterns. Gene ontology (GO) enrichment analysis for DEGs involved in significant expression patterns was performed using WEGO software. KEGG enrichment analysis for DEGs associated with significant expression patterns was carried out by using Blastall. Finally, RT-qPCR analysis of six randomly selected DEGs was performed to validate the RNA-seq data.【Results】The RNA-seq of *A. apis* produced 25 454 076 raw reads, and after filtration, 24 909 820 clean reads with Q30 above 93.46% were obtained. Trend analysis results showed that 19 893 DEGs were grouped into eight gene expression patterns, among which 12 151 DEGs were assigned to three expression patterns with significantly up-regulated expression trend. GO enrichment analysis results indicated that all DEGs within significantly up-regulated expression patterns were enriched in 40 GO terms, and the mostly enriched one was cellular process (2 601 unigenes), followed by metabolic process (2 553 unigenes) and cell (2 522 unigenes). KEGG enrichment analysis result displayed that all DEGs within significantly up-regulated expression patterns were enriched in 119 metabolism pathways, and the mostly enriched one was ribosome (213 unigenes), followed by biosynthesis of amino acids (154 unigenes) and protein processing in endoplasmic reticulum (130 unigenes). Furthermore, it was found that 48 DEGs were enriched in MAPK signaling pathway, and the cluster result suggested that the expression levels of these DEGs increased as the stressing time prolonged. RT-qPCR results demonstrated that the expression patterns of the six DEGs were consistent with those of RNA-seq data, confirming that our transcriptome data are credible.【Conclusion】The findings in this study not only provide the key information for uncovering the pathogenesis of *A. apis* at the molecular level, but also lay a foundation for clarifying the pathogen-host interaction in *A. m. ligustica* under the stress of *A. apis*.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; *Ascosphaera apis*; larval gut, RNA-seq; transcriptome; differentially expressed genes (DEGs)

据报道,蜜蜂为全球70%的作物和野生植物授粉(Klein *et al.*, 2007; Elke, 2010)。蜜蜂易遭受多种病原危害而罹患细菌病、真菌病、病毒病等疾病(Evans and Spivak, 2010),其中,白垩病(chalkbrood)是一种最具代表性的蜜蜂真菌病,1913年Massen在德国首次报道了对白垩病的观察(Aronstein and Murray, 2010),中国大陆1990年发生白垩病(梁勤和陈大福, 2008)。近年来,随着蜂产品贸易的全球化,白垩病的发病率逐年上升(Aizen *et al.*, 2009)。白垩病是由蜜蜂球囊菌 *Ascosphaera apis* 特异性侵染蜜蜂幼虫而导致的疾病,发病时期一般为春季和初夏,虽不对蜂群造成毁灭性打击,但却能造成成年蜜蜂数量的大幅下降,从而严重影响蜂蜜等产品的产量(Bailey, 1963),据报道,该病可造成蜂蜜产量下降5% ~37%(Zaghloul *et al.*, 2005)。国内养蜂生产中使用的主要蜂种是意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*(属于西方蜜蜂 *A. mellifera*,简称意蜂)和中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*(属于东方蜜蜂 *A. cerana*,简称中蜂),前者极易被球囊菌侵染而罹患白垩病,而后者具有较强的球囊菌抗性。球囊菌对蜜蜂幼虫的侵染主要是通过蜜蜂的取食活动,含球囊菌孢子的食物被蜜蜂摄入体内,孢子在蜜蜂消化道萌发生长,继而突破消化道围食膜和中肠屏障,在体腔大量生长繁殖,导致蜜蜂幼虫死亡,最后突破体表,异宗菌丝接触形成大量子代孢子(李江红等, 2012)。

近20年来,国内外学者在培养方法(Anderson and Gibson, 1998; Laf, 2015)、形态学(Spiltoir, 1955; Skou, 1988; Anderson and Gibson, 1998)、病理学(Bailey and Ball, 1991; Theantana and Chantawannakul, 2008)、流行病学(Flores *et al.*, 2005a, 2005b)、增殖方式(Pöggeler, 2001;

Chorbiński, 2003)、蜜蜂防御(Stanley *et al.*, 2009; Evans and Spivak, 2010)以及疾病防治(Hornitzky, 2001; Tarpy, 2003; Mourad *et al.*, 2005)等方面对白垩病开展了一系列研究。本课题组也在球囊菌的病理和检测方面开展了较为系统的研究,如梁勤等(2001)从碳源、氮源、维生素、矿质元素等方面研究了营养生态条件对球囊菌生长及产孢的影响,结果表明营养生态条件的变化对球囊菌的影响极大;郑志阳等(2011)对健康和患病蜜蜂幼虫血淋巴进行SDS-PAGE电泳和蛋白酶、酯酶的活性染色,发现健康蜜蜂幼虫血淋巴中的蛋白含量丰富,主要由4种高分子质量的蛋白组成,而患病幼虫血淋巴中的蛋白含量很少,主要蛋白组分被降解,多种蛋白酶和酯酶的活性在患病幼虫血淋巴中可以检测到,而在健康幼虫中检测不到。然而,由于基因组信息的缺失,球囊菌在分子水平的研究进展缓慢。2006年Qin等公布了球囊菌ARSEF7406菌株的基因组序列(Qin *et al.*, 2006),为球囊菌的分子研究奠定了基础,但作者当时并未公布基因的位置和功能注释信息。Cornman等(2012)利用Roche 454焦磷酸测序技术对来自培养基的球囊菌菌丝和来自蜜蜂幼虫感染组织的球囊菌菌丝进行了转录组测序,功能分析表明球囊菌的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)参与了交配类型、细胞内信号转导和应激反应。

目前,有关球囊菌的组学研究极少,白垩病过程中的病原-宿主互作机制尚不明确。前期研究中,我们已成功组装球囊菌的参考转录组并对其进行功能及代谢通路注释(张曌楠等, 2017),可为利用胁迫意蜂幼虫肠道的球囊菌的转录组学研究提供重要的参考信息。本研究在前期研究基础上对胁迫意蜂幼虫肠道的球囊菌的差异表达基因(DEGs)进行转录组分析,研究结果可为阐释球囊菌的致病机理及球囊菌-意蜂幼虫的互作机制提供重要信息,也为白垩病的防治奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试蜜蜂幼虫与球囊菌

本研究使用的意蜂幼虫取自福建农林大学蜂学学院教学蜂场,球囊菌菌株由福建农林大学蜂学学院蜜蜂保护实验室保存并活化。

1.2　主要实验试剂及仪器

DNaseI和Oligotex mRNA Kits Midi试剂盒购自德国Qiagen公司,高碘酸钠购自美国Sigma公司,DNA Ligase购自美国Thermo公司,RNAiso Reagent抽提试剂盒、Ex Taq Polymerase及Superscript Ⅱ Reverse Transcriptase均购自日本TaKaRa公司。cDNA文库构建试剂盒TruSeq™ DNA Sample Prep Kit v2-Set A为美国Illumina公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

恒温恒湿气候箱购自中国宁波江南仪器厂,超净工作台购自中国苏州安泰空气技术有限公司,超低温冰箱购自合肥中科美菱低温科技股份有限公司,实时荧光定量PCR仪(ABI 7500)为美国Life公司产品。

1.3　意蜂幼虫饲养与球囊菌孢子纯化

意蜂幼虫的饲料配方参照王倩等(2009)的方法配制。预实验结果显示7日龄意蜂幼虫的成活率可达70%以上。将2日龄幼虫移至24孔板培养板,35℃,相对湿度70%条件下饲养,每24 h更换饲料。

将4℃保存的球囊菌培养皿置于已紫外灭菌的超净台,用酒精灯上灼烧片刻的镊子夹取少量菌丝在平板中央2 cm左右圆心区域内划线操作,盖上培养皿,置于37℃生化箱恒温培养,3 d后观察球囊菌生长情况。接种8～10 d以后,待培养皿上黑色孢子较多时,将孢子刮至干净的EP管中,充分研磨后按照Jensen等(2013)离心纯化,梯度稀释后用血球计数板对孢子进行计数。

1.4　深度测序样品准备

将高浓度的球囊菌纯化孢子混入人工饲料,稀释至1×10^7孢子/mL,饲喂3日龄幼虫,4日龄开始饲喂不含球囊菌孢子的正常饲料。分别剖取球囊菌胁迫的4, 5和6日龄意蜂幼虫肠道样品(分别记为AamT1, AamT2和AamT3),液氮速冻后迅速转移至超低温冰箱保存备用。上述各样品均设3个生物学重复。

1.5　cDNA文库构建及Illumina测序

利用RNAiso Reagent试剂盒抽提1.4节各样品的总RNA,然后用RNase-free DNase Ⅰ去除基因组DNA残留。RNA的质量通过琼脂糖凝胶电泳和NanoDrop ND-2000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA)进行检测。利用Oligotex mRNA Kits Midi试剂盒说明书,纯化各样品总RNA中的mRNA。以10 μg mRNA作为模板,GsuI-oligo dT作为反转录引物,用1 000 U Superscript Ⅱ Reverse Transcriptase在42℃下孵育1 h合成cDNA第1链;随后利用高碘酸

钠氧化 mRNA 的 5′端帽子结构,并连接生物素;通过 Dynal M280 磁珠筛选连接了生物素的 mRNA/cDNA,并通过碱裂解释放 cDNA 第 1 链;然后通过 DNA Ligase 在 cDNA 第 1 链的 5′末端加上接头,利用 Ex Taq polymerase 合成 cDNA 第 2 链。最后,通过 *Gsu* Ⅰ 酶切除 polyA 和 5′端接头。利用 Ampure beads 对上述 cDNA 进行纯化,cDNA 文库通过 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit-Set A 进行构建和 TruSeq PE Cluster Kit 进行扩增。上述 9 个样品的深度测序委托广州基迪奥生物科技有限公司完成,测序平台为 Illumina Hiseq 2500,采用双端(PE125)测序。本研究测得的转录组数据已上传美国国家生物技术信息中心(NCBI)SRA 数据库,SRA 号为 SRA454366。

1.6　测序数据的质控与定位

对于下机数据,利用 Perl 脚本去除含有 adaptor、未知核苷酸比例大于 5% 和低质量 reads,获得有效读段(clean reads)。使用短 reads 比对工具 bowtie(Langmead *et al*., 2009)分别将各样品的 clean reads 映射(mapping)到核糖体数据库(最多允许 5 个错配)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=apis%20mellifera),去除映射上核糖体的 reads,将保留下来的数据进一步映射意蜂的参考基因组(Amel_4.5, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/48?genome_assembly_id=22683),利用 SOAP aligner/soap2 软件(Hurgobin, 2016)将未映射上意蜂基因组的 reads 进而映射到前期已组装的球囊菌参考转录组(张曌楠等, 2017)。

1.7　胁迫意蜂幼虫肠道的球囊菌 DEGs 的趋势分析

利用 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)法计算基因表达量。利用 R 软件(version 2.16.2)计算各样品之间的相关性系数。利用 edgeR 软件(Robinson *et al*., 2010)进行 DEG 分析(AamT2 *vs* AamT1 和 AamT3 *vs* AamT1)。DEG 的筛选标准为 FDR≤0.05 且 $|\log_2 \text{Fold change}| \geq 1$。

为了对各样品 4, 5 和 6 日龄 3 个时间点的基因表达模式进行聚类,首先将基因表达量数据归一化为 $\log_2$(AamT1/AamT1), $\log_2$(AamT2/AamT1)和 $\log_2$(AamT3/AamT1),利用 STEM(Short Time-series Expression Miner, v1.3.8)软件(Ernst and Bar-Joseph, 2006)进一步分析基因表达模式。在所有的基因表达模式中,*P*-value≤0.05 的定义为显著表达模式。

1.8　Gene Ontology (GO)与 KEGG 代谢通路富集分析

利用 WEGO 软件(Ye *et al*., 2006)对上调表达模式和下调表达模式中的差异表达基因(DEGs)进行 GO 富集分析。利用 Blastall 将上调表达模式和下调表达模式中的 DEGs 比对 KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes)数据库,进行 KEGG 代谢通路富集分析。

1.9　RNA-seq 数据的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)验证

为了验证 RNA-seq 数据,随机选取 6 个 DEGs 进行 RT-qPCR。反应按照 SYBR Green Dye 试剂盒(Vazyme 公司, 中国)操作说明书进行。本实验进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。20 μL 的反应体系: SYBR Green Dye 10 μL,10.0 μmol/L 正、反向引物各 1 μL,cDNA 模板 DNA 1 μL,DEPC 水 7 μL。RT-qPCR 反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(Life 公司, 美国)上进行,反应条件:95℃ 预变性 1 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 延伸 30 s,共 40 个循环;最后 72℃ 延伸 45 s。所选基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)计算。

2　结果

2.1　RNA-seq 数据质控与评估

球囊菌胁迫意蜂幼虫肠道样品的 Illumina 测序共得到球囊菌 25 454 076 条 raw reads,进一步去除低质数据得到 24 909 820 条 clean reads,各样品 clean reads 数均在 2 253 412 (96.08%)以上,两端 Q20 均在 97.08% 以上,两端 Q30 均在 93.46% 以上(表 1),上述结果说明本研究测得的转录组数据质量良好,可用于进一步分析。

进一步对 AamT1, AamT2 和 AamT3 进行主成分分析(PCA),结果显示第一主成分(PC1)与第二主成分(PC2)共能分别解释样品基因表达总体方差的 88.2% 和 5.8% (图 1),各样品的组内重复性较好,而不同样品间的基因表达模式总体差异明显。

RNA-seq 数据比对球囊菌参考转录组情况统计显示,各样品 clean reads 比对上参考转录组的比例均在 88.52% 以上,AamT1, AamT2 与 AamT3 的表达基因数目分别为 15 881, 17 682 和 20 026 个,分别占球囊菌参考转录组的 37.28%, 41.50% 和 47.01% (表 2)。

表 1　胁迫意蜂不同日龄幼虫肠道的球囊菌的 RNA-seq 数据统计

Table 1　RNA-seq datasets of *Ascosphaera apis* stressing different instar larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

样品 Samples	原始读段 Raw reads	有效读段(占原始读段的百分比) Clean reads (percent of raw reads)	99% 碱基正确数量和比例 Number and proportion of the 99% correct bases (Q20)	99.9% 碱基正确数量和比例 Number and proportion of the 99.9% correct bases (Q30)
AamT1-1	2 528 840	2 469 622 (97.66%)	300 833 677 (97.45%)	291 359 297 (94.38%)
AamT1-2	2 737 168	2 693 106 (98.39%)	329 389 184 (97.85%)	319 906 239 (95.03%)
AamT1-3	3 023 132	2 980 240 (98.58%)	365 758 990 (98.18%)	356 656 737 (95.74%)
AamT2-1	3 178 228	3 122 140 (98.24%)	382 437 729 (97.99%)	372 349 837 (95.41%)
AamT2-2	2 547 204	2 501 890 (98.22%)	305 698 171 (97.75%)	296 488 524 (94.80%)
AamT2-3	2 814 364	2 768 034 (98.35%)	339 309 805 (98.07%)	330 557 642 (95.54%)
AamT3-1	3 229 530	3 178 978 (98.43%)	388 999 973 (97.89%)	378 044 002 (95.14%)
AamT3-2	2 345 336	2 253 412 (96.08%)	273 461 324 (97.08%)	263 268 347 (93.46%)
AamT3-3	3 050 274	2 942 398 (96.46%)	357 479 492 (97.19%)	344 314 704 (93.61%)

AamT1, AamT2, AamT3：分别是球囊菌胁迫的意蜂 4, 5 和 6 日龄幼虫肠道样品(各 3 个重复,仅 3 日龄幼虫饲喂含球囊菌的人工饲料) *A. apis*-stressed 4-, 5- and 6-day-old larval gut samples of *A. m. ligustica*, respectively (each with three replications, only 3-day-old larvae were fed with the artificial diet containing *A. apis*). 下同 The same below.

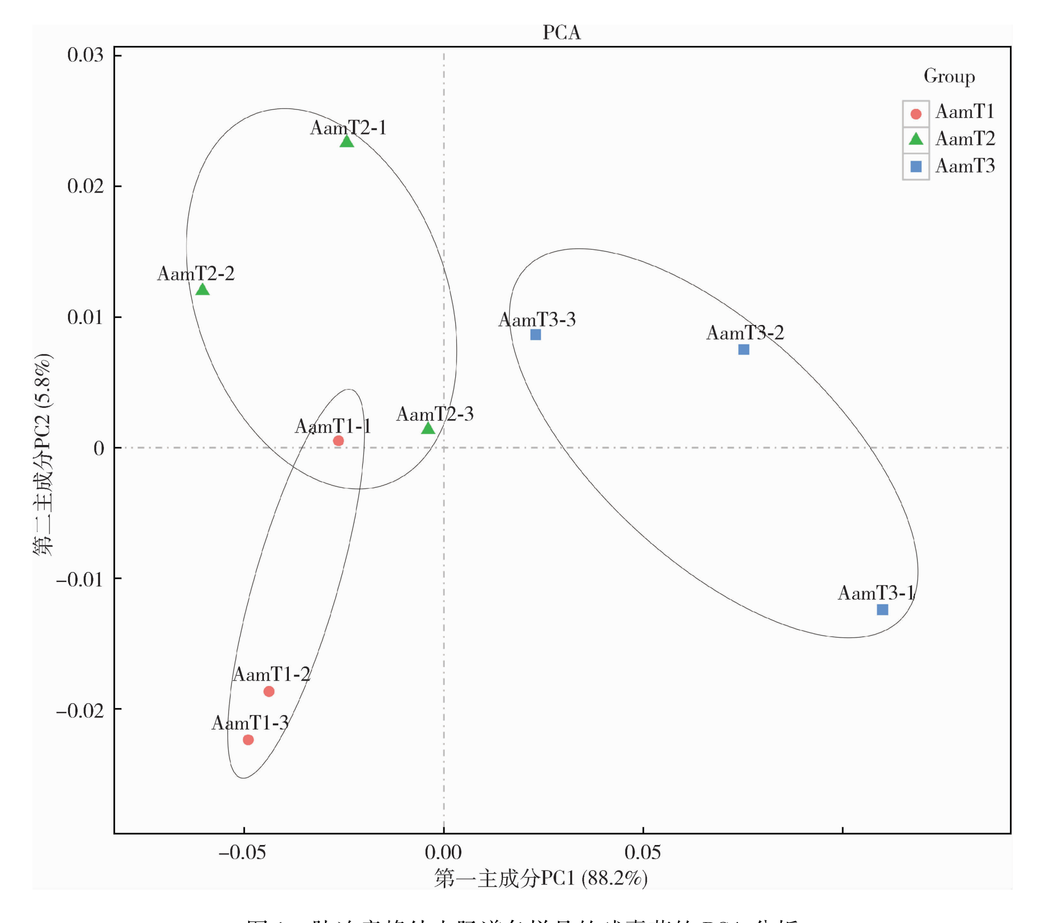


图 1　胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌的 PCA 分析

Fig. 1　PCA analysis of *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

表 2 胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌的表达基因数量统计

Table 2 Summary of the expressed genes in *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

样品 Samples	表达基因数 Number of expressed genes	表达基因比例(%) Proportion of expressed genes
AamT1	15 881	37.28
AamT2	17 682	41.50
AamT3	20 026	47.01

2.2 胁迫意蜂幼虫肠道的球囊菌 DEGs 的趋势分析

利用 STEM 软件对 AamT1，AamT2 和 AamT3 的表达基因进行趋势分析，结果显示 19 893 个 DEGs 共聚类为 8 个表达模式(profile0，profile1，profile2，profile3，profile4，profile5，profile6 和 profile7)(图 2)，其中有 12 151 个 DEGs 聚类为 3 个表现显著上升趋势的表达模式(profile4，profile6 和 profile7)(*P*-value < 0.05)(图 2)。profile4 包含 5 953 个 DEGs，profile6 包含 2 557 个 DEGs，profile7 包含 3 641 个 DEGs。

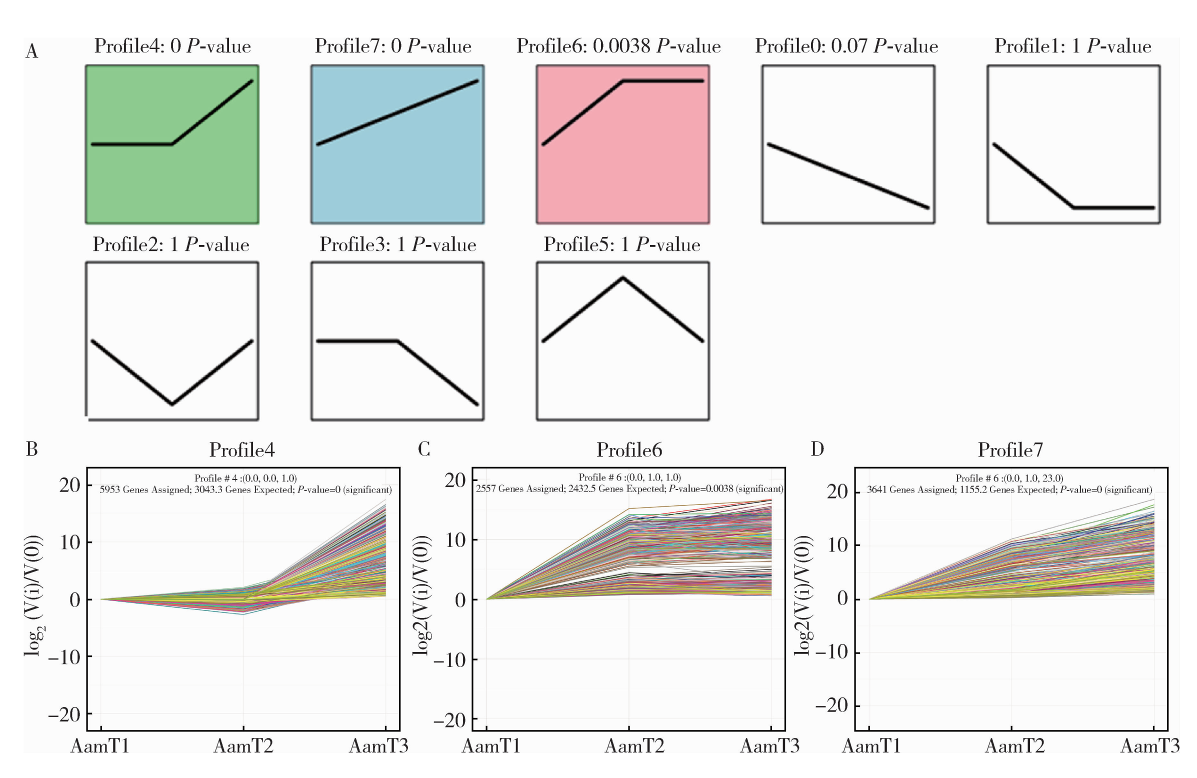


图 2 胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌 DEGs 的趋势分析

Fig. 2 Trend analysis of DEGs in *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

A：趋势分析结果 Trend analysis result；B：profile4 包含 DEGs 的表达模式 Expression patterns of profile4；C：profile6 包含 DEGs 的表达模式 Expression patterns of profile6；D：profile7 包含 DEGs 的表达模式 Expression patterns of profile7.

2.3 GO 富集分析

上调趋势中所有 DEGs 的 GO 分类结果显示，这些 DEGs 分为 3 类：生物学进程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)，它们富集于 40 个 GO term，分别为细胞进程(cellular process)、代谢进程(metabolic process)、细胞(cell)、细胞组件(cell part)、催化活性(catalytic activity)、单组织进程(single-organism process)、结合(binding)、细胞器(organelle)、大分子复合物(macromolecular complex)、细胞器组件(organelle part)、生物调控(biological regulation)、定位(localization)、细胞膜(membrane)、细胞成分组织(cellular component organization or biogenesis)、细胞膜组件(membrane part)、应激(response to stimulus)、转运器活性(transporter activity)、结构分子活性(structural molecule activity)、膜内腔(membrane-enclosed lumen)、信号(signaling)、发育进程(developmental process)、生殖(reproduction)、生殖进程(reproductive process)、核苷酸结合转录因子活性(nucleic acid binding transcription factor activity)、分子功能调节器(molecular function regulator)、生长(growth)、多组织进程(multi-organism process)、病毒

粒子(virion)、病毒粒子组件(virion part)、多细胞生物进程(multicellular organismal process)、分子传感器活性(molecular transducer activity)、抗氧化活性(antioxidant activity)、转录因子结合蛋白活性(transcription factor activity, protein binding)、电子载体活性(electron carrier activity)、拟核(nucleoid)、信号传感器活性(signal transducer activity)、解毒作用(detoxification)、胞外区(extracellular region)、细胞连接(cell junction)、生物附着(biological adhesion)(图3)。富集基因数最多的 GO term 为细胞进程(2 601 unigenes),其次为代谢进程(2 553 unigenes)和细胞(2 522 unigenes)(图3)。

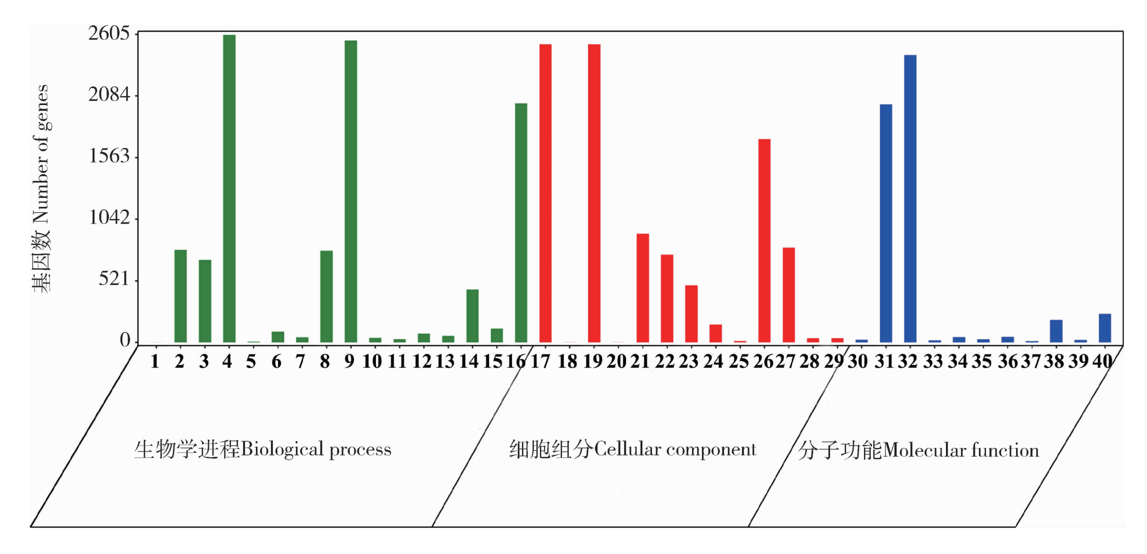


图 3　胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌 DEGs 中表达上调基因的 GO 富集分析

Fig. 3　GO enrichment analysis for the up-regulated expressed DEGs in *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

1：生物附着 Biological adhesion；2：生物调控 Biological regulation；3：细胞组分组织或生物合成 Cellular component organization or biogenesis；4：细胞进程 Cellular process；5：解毒作用 Detoxification；6：发育进程 Developmental process；7：生长 Growth；8：定位 Localization；9：代谢进程 Metabolic process；10：多组织进程 Multi-organism process；11：多细胞生物进程 Multicellular organismal process；12：生殖 Reproduction；13：生殖进程 Reproductive process；14：应激 Response to stimulus；15：信号 Signaling；16：单组织进程 Single-organism process；17：细胞 Cell；18：细胞连接 Cell junction；19：细胞组件 Cell part；20：胞外区 Extracellular region；21：大分子复合物 Macromolecular complex；22：细胞膜 Membrane；23：细胞膜组件 Membrane part；24：细胞膜内腔 Membrane enclosed lumen；25：拟核 Nucleoid；26：细胞器 Organelle；27：细胞器组件 Organelle part；28：病毒粒子 Virion；29：病毒粒子组件 Virion part；30：抗氧化活性 Antioxidant activity；31：结合 Binding；32：催化活性 Catalytic activity；33：电子载体活性 Electron carrier activity；34：分子功能调节因子 Molecular function regulator；35：分子传感器活性 Molecular transducer activity；36：核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity；37：信号传感器活性 Signal transducer activity；38：结构分子活性 Structural molecule activity；39：转录因子活性，蛋白结合 Transcription factor activity, protein binding；40：转运活性 Transporter activity.

2.4　KEGG 代谢通路富集分析

对上调趋势中所有 DEGs 进行 KEGG 代谢通路富集分析,结果显示这些 DEGs 富集在 119 个代谢通路上,其中富集基因数量最多的是核糖体(ribosome)(213 unigenes),其次为氨基酸生物合成(biosynthesis of amino acids)(154 unigenes)和内质网蛋白加工(protein processing in endoplasmic reticulum)(130 unigenes)(图 4，表 3)。富集基因数前 20 位的代谢通路如表 3 所示,有大量 DEGs 富集在各类物质代谢,如碳代谢(carbon metabolism)(129 unigenes)、嘌呤代谢(purine metabolism)(119 unigenes)、嘧啶代谢(pyrimidine metabolism)(86 unigenes)以及半胱氨酸与蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)(57 unigenes)。共有 48 个 DEGs 富集在 MAPK 信号通路上,对富集在 MAPK 信号通路上的基因进行表达量聚类,结果显示随着胁迫时间的延长,富集在该通路上的基因表达水平显著增强(图 5)。

2.5　RNA-seq 数据中球囊菌 DEGs 表达水平的 RT-qPCR 验证

利用 RT-qPCR 检测随机选取的 6 个 DEGs,包括 1 个组蛋白 H4.1 编码基因、1 个 Pc20g13990 蛋白编码基因、3 个未知基因和 1 个醛酮还原酶编码基因。结果显示这些 DEGs 的表达水平变化趋势与 RNA-seq 数据中的基因表达水平变化趋势一致(图 6),证明本研究获得的转录组数据真实可靠。

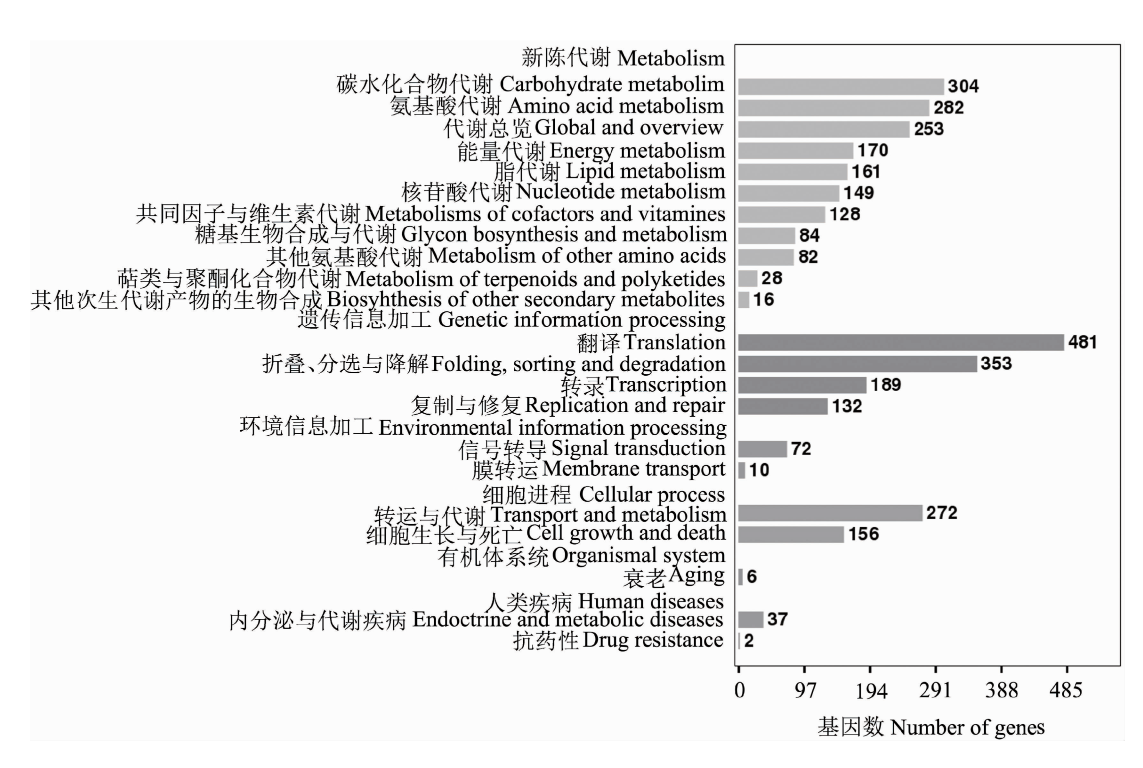


图 4 胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌 DEGs 表达上调基因的 KEGG 代谢通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis for the up-regulated expressed DEGs in *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

表 3 上升趋势中富集基因数前 20 位的代谢通路

Table 3 Top 20 pathways enriched by unigenes within the up-regulated expression profiles

代谢通路 Metabolic pathway	基因数 Number of genes	*P*-value	*Q*-value	代谢通路 ID Pathway ID
核糖体 Ribosome	213	5.09E-06	0.000303	ko03010
氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	154	0.166726	0.901836	ko01230
内质网蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	130	0.614214	0.997893	ko04141
碳代谢 Carbon metabolism	129	0.921245	0.997893	ko01200
嘌呤代谢 Purine metabolism	119	0.522226	0.997893	ko00230
剪接体 Spliceosome	119	0.847405	0.997893	ko03040
细胞周期-酵母 Cell cycle - yeast	114	0.000156	0.006176	ko04111
减数分裂-酵母 Meiosis - yeast	111	2.53E-06	0.000301	ko04113
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	111	0.369017	0.997893	ko00190
RNA 转运 RNA transport	111	0.899856	0.997893	ko03013
内吞作用 Endocytosis	103	0.818927	0.997893	ko04144
泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	91	0.414170	0.997893	ko04120
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	86	0.559692	0.997893	ko00240
真核生物核糖体生物合成 Ribosome biogenesis in eukaryotes	85	0.626941	0.997893	ko03008
RNA 降解 RNA degradation	72	0.539455	0.997893	ko03018
糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	69	0.263767	0.997893	ko00010
mRNA 监视代谢通路 mRNA surveillance pathway	65	0.432491	0.997893	ko03015
吞噬体 Phagosome	63	0.772199	0.997893	ko04145
核苷酸切除修复 Nucleotide excision repair	57	0.129344	0.810104	ko03420
半胱氨酸与蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	57	0.19747	0.903804	ko00270

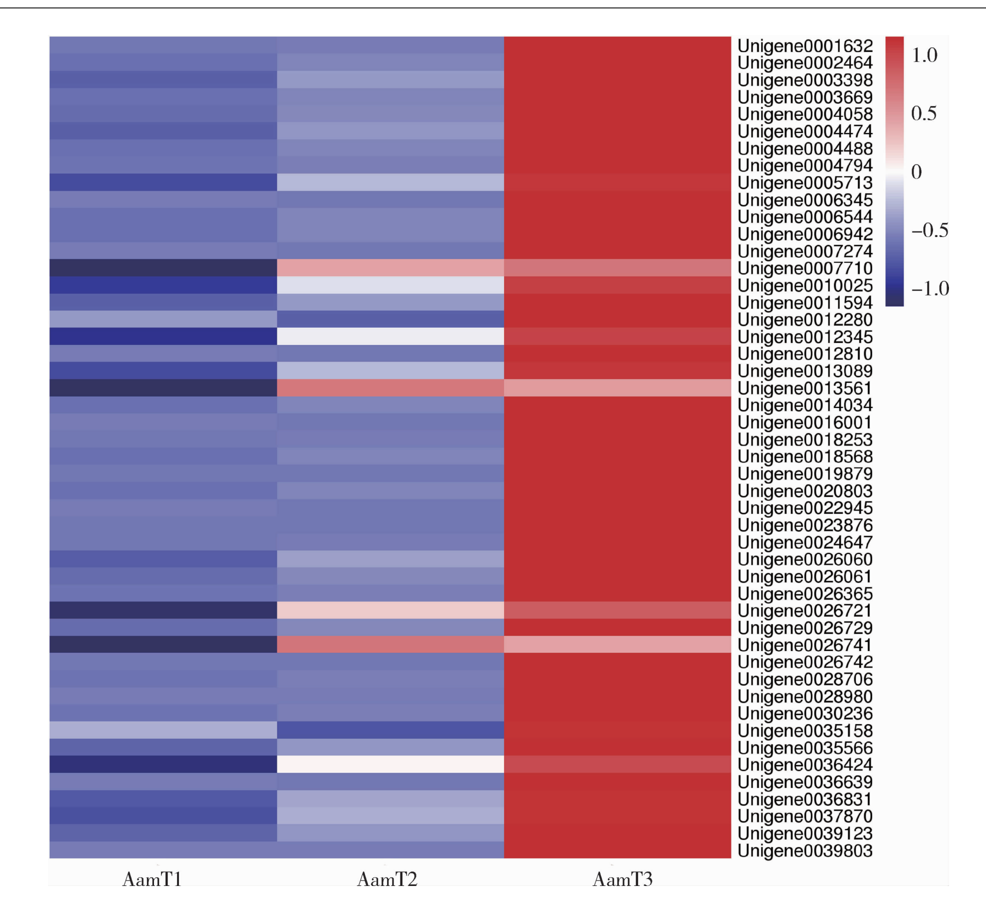


图 5　MAPK 信号通路富集基因的热图

Fig. 5　Heatmap of unigenes enriched in MAPK signaling pathway

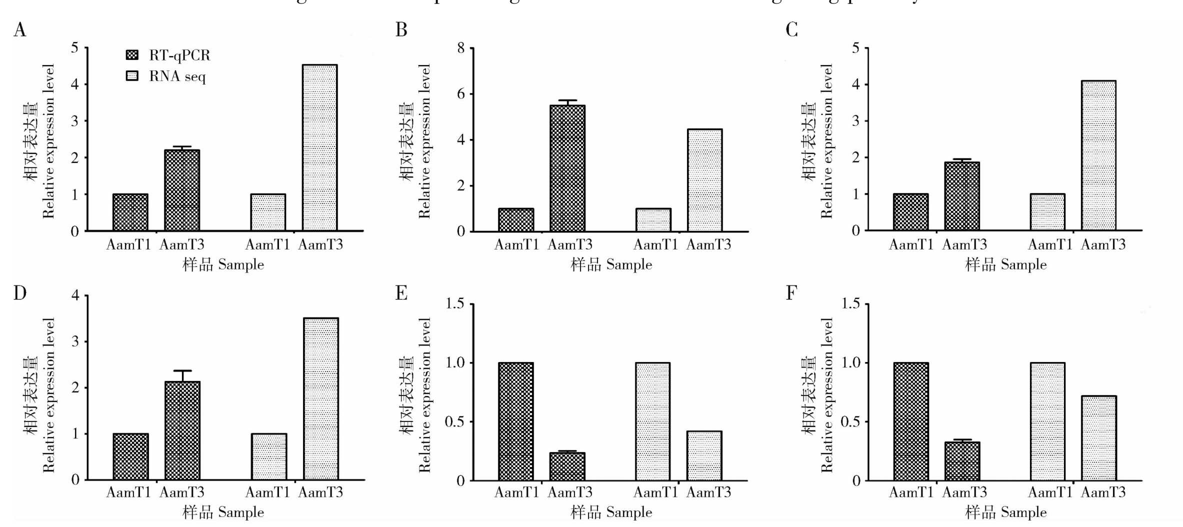


图 6　胁迫意蜂幼虫肠道各样品的球囊菌 RNA-seq 数据的 RT-qPCR 验证

Fig. 6　RT-qPCR validation of RNA-seq data of *Ascosphaera apis* stressing larval gut samples of *Apis mellifera ligustica*

A：组蛋白 H4.1 编码基因 Histone H4.1 encoding gene；B：Pc20g13990 蛋白编码基因 Pc20g13990 encoding gene；C－E：未知基因 Unknown gene；F：醛酮还原酶编码基因 Aldo-keto reductase encoding gene.

3　讨论

此前，本课题组 *de novo* 组装并注释了球囊菌的参考转录组（张曌楠等，2017），为球囊菌的转录组学研究奠定了基础。在 Cornman 等（2012）的研究中，测序对象是来自培养基的球囊菌菌丝和来自蜜蜂幼虫感染组织的球囊菌菌丝，其中后者是感染幼

虫肠道内萌发的菌丝穿透肠壁后继续生长最后突破体表的菌丝,其转录组变化并不能精确反映侵染过程中球囊菌的基因表达情况,因为此时的菌丝已经不与宿主互作。本研究的测序对象胁迫意蜂幼虫肠道的球囊菌,肠道内的球囊菌通过与宿主的互作促进侵染过程,故通过映射意蜂参考基因组过滤得到的球囊菌转录组数据,能更精确地反映病原在侵染过程中的基因表达谱。

养蜂生产中,意蜂幼虫是球囊菌易感蜂种。本研究中,趋势分析结果显示,胁迫的意蜂幼虫肠道的球囊菌 DEGs 的显著表达模式皆为上调趋势,说明在胁迫意蜂幼虫肠道的过程中,球囊菌的基因在很大程度上被激活。本研究发现在胁迫意蜂幼虫肠道过程中,球囊菌参与物质代谢的多数基因均表现出上调趋势,大量 DEGs 富集在多达 80 个物质代谢通路,包括碳水化合物代谢、脂代谢和氨基酸代谢等。伴随物质代谢的增强,球囊菌的能量代谢在侵染过程中显著增强,表现为参与能量代谢的多数基因呈现上调趋势,这些基因富集在 4 个能量代谢通路上,如氧化磷酸化代谢通路中的 V 型 ATP 酶 F 亚基编码基因(unigene0000213)、NADH 脱氢酶亚基 5 编码基因(unigene0002084)和 NADH-辅酶 Q 氧化还原酶编码基因(unigene0003823)等。推测球囊菌和意蜂幼虫通过病原-宿主互作使二者相互适应,球囊菌在宿主肠道内通过增强物质和能量代谢来促进侵染过程。

在胁迫意蜂幼虫肠道的过程中,球囊菌需不断合成遗传物质和蛋白质,从而满足增殖需要,本研究发现大量参与遗传物质与蛋白质合成的基因显著上调,如 DNA 复制(DNA replication)中的复制因子 C 亚基 1 编码基因(unigene0002253)、DNA 复制许可因子 MCM4 编码基因(unigene0004671)及核糖核酸酶 H2 亚基 C 编码基因(unigene0006412);RNA 转运(RNA transport)中的翻译起始因子 3 亚基 J 编码基因(unigene0002179)、核糖核酸酶 P 复合物亚基 Pop4 编码基因(unigene0004409)及精氨酸 N-甲基转移酶 Skb1 编码基因(unigene0006216)等;核糖体中的 60S 核糖体蛋白 L7 编码基因(unigene0000035)、60S 核糖体蛋白 L21-A 编码基因(unigene0000859)及 60S 核糖体蛋白 L15 编码基因(unigene0041982)等;氨基酸生物合成代谢通路中的丙酮酸羧化酶编码基因(unigene0024192)、3-磷酸甘油醛脱氢酶编码基因(unigene0008207)及果糖-二磷酸醛缩酶 A 编码基因(unigene0041009)等;内质网蛋白质加工代谢通路中的泛素家族蛋白编码基因(unigene0001921)、ATP 依赖的分子伴侣 HSC82(unigene0002086)及热激蛋白 90-2 编码基因(unigene0036009)等。

真菌可通过精细而保守的信号通路,如调节黑色素形成、配合、毒力以及形态发生等来感知外界环境并迅速做出应答(Cornman *et al*., 2012)。在真菌的信号通路中,MAPK 信号通路最为关键,在真菌致病性及响应环境胁迫方面发挥重要作用(Perez and Cansado, 2010)。本研究发现 48 个 DEGs 富集在 MAPK 信号通路上,如 MAPK MKC1 编码基因(unigene0001632)、MAPK 激酶 MKK1/SSP32 编码基因(unigene0003669)以及核孔复合物蛋白 An-Mlp1 编码基因(unigene0039803)等。本研究还发现上述 DEGs 的表达水平随着球囊菌胁迫时间的延长而显著增强(图 5),推测该通路在球囊菌对意蜂幼虫的致病性方面发挥关键作用,通过 RNAi 技术对该通路上的基因进行沉默,或许是治疗白垩病的一种可行途径。

本研究利用 RNA-seq 技术对球囊菌胁迫的意蜂幼虫肠道进行深度测序,基于趋势分析进一步对胁迫过程中的球囊菌进行转录组学分析,研究结果为在分子水平揭示球囊菌的致病机理提供了重要信息,也为阐释白垩病过程中的病原-宿主互作机制奠定了基础。

参考文献(References)

Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM, 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.*, 103(9): 1579-1588.

Anderson DL, Gibson NL, 1998. New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: Ascosphaerales) from Australia. *Aust. Syst. Bot.*, 11(1): 53-72.

Aronstein KA, Murray KD, 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103: S20-S29.

Bailey L, 1963. Infectious Diseases of the Honeybee. Land Books, London.

Bailey L, Ball BV, 1991. Honey Bee Pathology. Academic Press, London & San Diego.

Chorbiński P, 2003. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*. *Med. Weter.*, 59(11): 1019-1022.

Cornman RS, Bennett AK, Murray KD, Evans JD, Elsik CG, Aronstein K, 2012. Transcriptome analysis of the honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*: implications for host pathogenesis. *BMC Genomics*, 13(7): 285.

Elke G, 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87(1): 87-97.

Ernst J, Bar-Joseph Z, 2006. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinform.*, 7(1): 1 - 11.

Evans JD, Spivak M, 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*, 103 (1): S62 - S72.

Flores JM, Gutierrez I, Espejo R, 2005a. The role of pollen in chalkbrood diseasein *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia*, 97: 1171 - 1176.

Flores JM, Spivak M, Gutierrez I, 2005b. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Vet. Microbiol.*, 108(1 - 2): 141 - 144.

Hornitzky M, 2001. Literature review of chalkbrood, a fungal disease of honeybees. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, Australia.

Hurgobin B, 2016. Short read alignment using SOAP2. In: Edwards D ed. Plant Bioinformatics: Methods and Protocols. 2nd ed. Methods in Molecular Biology, Vol. 1374. Humana Press, New York, NY. 241 - 252.

Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M, 2013. Standard methods for fungal brood disease research. *J. Apic. Res.*, 52(1): 10.3896/IBRA.1.52.1.13.

Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 274(1608): 303 - 313.

Laf H, 2015. Chalk brood pathogens: a review. *Bee World*, 16(6): 865 - 869.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL, 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*, 10(3): R25.

Li JH, Zheng ZY, Chen DF, Liang Q, 2012. Factors influencing *Ascosphaera apis* infection on honeybee larvae and observation on the infection process. *Acta Entomol. Sin.*, 55(7): 790 - 797. [李江红, 郑志阳, 陈大福, 梁勤, 2012. 影响蜜蜂球囊菌侵染蜜蜂幼虫的因素及侵染过程观察. 昆虫学报, 55(7): 790 - 797]

Liang Q, Chen DF, 2008. Honeybee Protection. China Agriculture Press, Beijing. [梁勤, 陈大福, 2008. 蜜蜂保护学. 北京: 中国农业出版社]

Liang Q, Chen DF, Wang JD, 2001. Effects on the mycelia growth and spore-forming of *Ascosphaera apis* under ecological condition of nutrients. *Chin. J. Eco-Agric.*, (9): 31 - 34. [梁勤, 陈大福, 王建鼎, 2001. 营养生态条件对蜜蜂球囊菌生长及产孢的影响. 中国生态农业学报, (9): 31 - 34]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Anaysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25: 402 - 408.

Mourad AK, Zaghloul OA, Kady EL, Nemat FM, Morsy ME, 2005. A novel approach for the management of the chalkbrood disease infesting honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Egypt. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 70(4): 601 - 611.

Pérez P, Cansado J, 2010. Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 11(8): 680 - 692.

Pöggeler S, 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of *Ascomycetes*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 56: 589 - 601.

Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM, 2006. Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 715 - 718.

Robinson MD, Mccarthy DJ, Smyth GK, 2010. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1): 139 - 140.

Skou JP, 1988. More details in support of the class *Ascosphaeromycetes*. *Mycotaxon*, 51(1): 191 - 198.

Spiltoir CF, 1955. Life cycle of *Ascosphaera apis* (*Pericystis apis*). *Am. J. Bot.*, 42(6): 501 - 508.

Stanley D, Miller J, Tunaz H, 2009. Eicosanoid actions in insect immunity. *Innate Immun.*, 1: 282 - 290.

Tarpy DR, 2002. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 270(1510): 99 - 103.

Theantana T, Chantawannakul P, 2008. Protease and β-N acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *J. Apicult. Res.*, 47 (1): 68 - 76.

Wang Q, Sun LX, Xiao PX, Liu F, Kang MJ, Xu BH, 2009. Study on technology for indoor artificial feeding of *Apis cerana cerana* larvae. *Shandong Agric. Sci.*, (11): 113 - 116. [王倩, 孙亮先, 肖培新, 刘锋, 康明江, 胥宝华, 2009. 室内人工培育中华蜜蜂幼虫技术研究. 山东农业科学, (11): 113 - 116]

Ye J, Fang L, Zheng H, Zhang Y, Chen J, Zhang Z, Wang J, Li S, Li R, Bolund L, Wang J, 2006. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. *Nucleic Acids Res.*, 34: 293 - 297.

Zaghloul OA, Mourad AK, Kady MBE, Nemat FM, Morsy ME, 2005. Assessment of losses in honey yield due to the chalkbrood disease, with reference to the determination of its economic injury levels in Egypt. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 70 (4): 703 - 714.

Zhang ZN, Xiong CL, Xu XJ, Huang ZJ, Zheng YZ, Luo Q, Liu M, Li WD, Tong XY, Zhang Q, Liang Q, Guo R, Chen DF, 2017. *De novo* assembly of a reference transcriptome and development of SSR markers for *Ascosphaera apis*. *Acta Entomol. Sin.*, 60(1): 34 - 44. [张曌楠, 熊翠玲, 徐细建, 黄枳腱, 郑燕珍, 骆群, 刘敏, 李汶东, 童新宇, 张琦, 梁勤, 郭睿, 陈大福, 2017. 蜜蜂球囊菌的参考转录组 *de novo* 组装及 SSR 分子标记开发. 昆虫学报, 60(1): 34 - 44]

Zheng ZY, Li JH, Liang Q, Chen DF, 2011. *Ascosphaera apis* secretes multiple extracellular enzymes to infect honeybee larvae. *J. Fujian Agric. Forest. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 40(3): 280 - 284. [郑志阳, 李江红, 梁勤, 陈大福, 2011. 蜜蜂球囊菌分泌多种胞外酶侵染蜜蜂幼虫. 福建农林大学学报(自然科学版), 40(3): 280 - 284]

(责任编辑：马丽萍)